



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Frequent epigenetic inactivation of <i>SFRP</i> genes in hepatocellular carcinoma. (肝臓における高頻度な Wnt シグナル活性化と <i>SFRP</i> 遺伝子のエピジェネティックな不活化)
Author(s) 著 者	高木, 秀安
Degree number 学位記番号	乙第 2800 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-12-04
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	乙第 2800 号	氏 名	高木 秀安
<p>論文題名</p> <p>肝臓における高頻度な Wnt シグナル活性化と SFRP 遺伝子のエピジェネティックな不活化</p> <p>研究目的</p> <p>Wnt シグナル経路の活性化は肝臓の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでの報告では、Wnt シグナル活性化の指標であるβ-catenin 蛋白の蓄積は、原発性肝臓の 50～80%に認められるとされている。しかし原発性肝臓における CTNNB1 (β-catenin)変異の頻度は約 20%、AXIN 変異は数%であり、APC 変異は報告されておらず、肝臓における Wnt シグナル活性化のメカニズムには不明な点が多い。近年我々は、分泌型 Frizzled 関連蛋白(SFRP)遺伝子群が、大腸癌・胃臓において高頻度にプロモーター領域の DNA メチル化を伴って発現消失しており、Wnt 経路異常活性化の一因となっていることを報告した。SFRP 蛋白は Wnt リガンドあるいはその受容体である Frizzled (Fz)と結合することで、Wnt と Fz の結合を阻害する。これまで我々は大腸発癌の極めて早期から一連の SFRP ファミリー遺伝子のメチル化が認められること、SFRP の過剰発現が胃臓・大腸癌細胞の Wnt シグナルを阻害し増殖を抑制することから、SFRP 遺伝子が新たな癌抑制遺伝子であることを明らかにした。本研究では、肝臓診療における新たな標的を見出すことを最終的な目的とし、肝臓における SFRP 遺伝子異常と Wnt シグナル経路の関係を解析することとした。</p> <p>研究方法</p> <p>ウェスタンブロット法により肝臓細胞株におけるβ-catenin 蛋白発現を解析した。更に、活性化型β-catenin (セリン 37 番およびスレオニン 41 番がリン酸化されていないβ-catenin) に特異的な抗体を用いて活性化型β-catenin 蛋白の発現解析を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫染色法により、肝臓細胞株におけるβ-catenin 蛋白の細胞内局在を解析した。TCF/LEF 応答性レポーター (pGL3-OT) を用いて、肝臓細胞株における TCF/LEF 転写活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した。Sodium bisulfite によって DNA を処理した後、Methylation-specific PCR (MSP)法および bisulfite シークエンス法によって肝臓細胞における SFRP 遺伝子のメチル化解析を行った。RT-PCR 法により肝臓細胞株の SFRP1、SFRP2、SFRP5 遺伝子および Wnt リガンド遺伝子 (Wnt1、Wnt2、Wnt2B、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt11) の発</p>			

現解析を行った。また、肝癌細胞を DNA メチル化酵素阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine よって処理し、脱メチル化による遺伝子発現回復を検討した。臨床例における SFRP 遺伝子異常の頻度を明らかにするため、生検材料より採取した原発性肝癌 19 例、慢性肝炎 37 例（B 型肝炎 18 例、C 型肝炎 19 例）、肝硬変 28 例（HBV 陽性 9 例、HCV 陽性 19 例）を対象として、MSP 法および Bisulfite シークエンス法による SFRP 遺伝子のメチル化解析を行った。SFRP1、SFRP2、SFRP5 発現ベクターをそれぞれ肝癌細胞株に導入し、SFRP の過剰発現が TCF/LEF 転写活性に与える影響を解析した。SFRP1 を siRNA によってノックダウンし、SFRP1 の発現低下が TCF/LEF 転写活性に与える影響を解析した。

研究成績及び考察

研究成績

我々はまず 12 株の肝癌細胞を用いて Wnt シグナル活性化の頻度および程度を明らかにした。ウェスタンブロット解析の結果、全ての肝癌細胞株で β -catenin 蛋白発現が認められ、そのうち 10 株において活性型 β -catenin 蛋白が検出された。蛍光免疫染色の結果、9 株が β -catenin 蛋白の核集積を示した。TCF/LEF 応答性レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、4 株において TCF/LEF 転写活性の上昇が認められ、そのうち CTNNB1 遺伝子異常を持つ HepG2 が特に顕著な活性化を示した。次に肝癌細胞における Wnt リガンド遺伝子の発現を RT-PCR によって解析した結果、全ての細胞株が複数の Wnt リガンドを発現していた。これらの結果から、活性化の程度は細胞ごとに異なっているが、ほぼ全ての肝癌細胞において Wnt シグナルの活性化が認められた。

次に我々は、Wnt シグナルの活性化が SFRP 遺伝子の不活化によるという仮説を立て、SFRP ファミリー遺伝子のメチル化を MSP 法および Bisulfite シークエンス法により解析した。その結果、SFRP1 のメチル化を 12 株中 9 株 (75%)、SFRP2 のメチル化を 7 株 (58%)、SFRP5 のメチル化を 7 株 (58%) において認めた。一方、SFRP 遺伝子のメチル化は正常肝組織では検出されなかった。RT-PCR 法により、肝癌細胞における SFRP 遺伝子のメチル化と発現の逆相関が確認された。SFRP 遺伝子がメチル化した細胞を、DNA メチル化酵素阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine で処理することで、遺伝子発現の回復が認められた。また、正常肝組織は SFRP1、SFRP2、SFRP5 の全てを発現していた。以上の結果から、肝癌細胞において SFRP ファミリー遺伝子が高頻度にメチル化によって抑制されていることが明らかとなった。

原発性肝癌症例検体 19 例におけるメチル化解析の結果、SFRP1 のメチル化を 9 例 (47%)、SFRP2 のメチル化を 12 例 (63%)、SFRP5 のメチル化を 8 例 (42%) に認めた。次に我々は前癌状態における SFRP 遺伝子のメチル化を明らかにするため、HBV あるいは HCV 陽性の慢性肝炎および肝硬変組織を解析した。慢性肝炎 37 例中、SFRP1 のメチル化を 6 例 (16%)、SFRP2 のメチル化を 14 例 (38%)、SFRP5 のメチル化を 5 例 (14%) に認めた。また肝硬変 28 例中、SFRP1 メチル化を 10 例 (36%)、SFRP2 のメチル化を

9 例 (32%)、SFRP5 のメチル化を 3 例 (11%) に認めた。

pGL3-OT を用いたレポーターアッセイで TCF/LEF 転写活性の上昇を示した肝癌細胞株 Hep3B において、SFRP1、SFRP2、SFRP5 を過剰発現させた結果、TCF/LEF 転写活性の抑制が見られた。次に我々は肝癌細胞 Li-7 を用いて siRNA による SFRP1 のノックダウンが TCF/LEF 転写活性に及ぼす影響を解析した。SFRP1 のノックダウンは、それ単独では TCF/LEF 転写活性を上昇させなかったが、変異型 β -catenin 発現ベクターと SFRP1 siRNA を同時にトランスフェクトすることで、TCF/LEF 転写活性が相乗的に上昇した。

考察

これまでの研究において SFRP ファミリー遺伝子が胃癌・大腸癌において高頻度にメチル化を受けていること、そして SFRP の不活化が胃癌・大腸癌の Wnt シグナル活性化の一因であることが明らかとなっている。今回、我々は肝癌においても SFRP 遺伝子メチル化が高頻度であることを明らかにした。肝癌における APC、CTNNB1、AXIN 変異が低頻度であることと併せると、SFRP メチル化は肝癌における Wnt シグナル活性化の主要なメカニズムの一つであると考えられる。

臨床症例における解析からも、原発性肝癌において SFRP1、SFRP2、SFRP5 のメチル化が高頻度であることが明らかとなった。メチル化異常が発生するメカニズムはいまだ不明だが、加齢および慢性炎症が遺伝子の高メチル化を促進させることが多くの研究者により指摘されている。今回我々は、HBV あるいは HCV 陽性の慢性肝炎および肝硬変においても SFRP 遺伝子がメチル化していることを明らかにした。このことから、SFRP 遺伝子のメチル化に慢性炎症が関与していることが示唆されると共に、SFRP のメチル化は肝発癌の早期に起こることが明らかとなった。

機能解析の結果、SFRP の過剰発現は肝癌細胞における TCF/LEF 転写活性を抑制した。またノックダウン実験から、SFRP1 の抑制のみでは TCF/LEF 転写活性が上昇しないが、 β -catenin の過剰発現と SFRP1 の抑制が相乗的に TCF/LEF 転写活性を亢進させることを明らかにした。これらの結果は、SFRP メチル化による Wnt シグナル活性化は、CTNNB1 変異による影響よりも軽度であることを示している。しかし、肝癌細胞株の多くは β -catenin 蛋白の蓄積を示しても TCF/LEF 転写活性の上昇を示さず、かつ SFRP ファミリー遺伝子のメチル化が CTNNB1 変異よりもはるかに高頻度であることを併せると、SFRP 遺伝子のメチル化は肝癌における高頻度な Wnt シグナル活性化の主要な原因の一つであると考えられた。

結論

以上の結果から、SFRP 遺伝子のメチル化と発現消失は肝癌において高頻度に見られる現象であり、SFRP 遺伝子不活化は肝癌における Wnt シグナル活性化の主因の一つである事が示された。また SFRP 遺伝子のメチル化は肝発癌の早期から発生することが明らかとなった。本研究の結果から、SFRP が肝癌の予防・早期診断そして治療の新たな分

子標的たりうる事が提示された。

論文審査の要旨及び担当者

(平成 26 年 12 月 4 日授与)

報告番号	乙第 2800 号	氏 名	高木 秀安
論文審査 担 当 者	主査 教授 篠村 恭久	副査 教授 鈴木 拓	
	委員 教授 加藤 淳二	委員 教授 時野 隆至	

論文題名	Frequent epigenetic inactivation of <i>SFRP</i> genes in hepatocellular carcinoma (邦題：肝臓における高頻度な Wnt シグナル活性化と <i>SFRP</i> 遺伝子のエピジェネティックな不活化)
結果の要旨 本研究により、 <i>SFRP</i> 遺伝子のメチル化は肝臓において高頻度に見られる現象であり、メチル化による <i>SFRP</i> 遺伝子不活化は肝臓における Wnt シグナル活性化の主要な原因の一つである事が示された。また臨床症例における解析からも、原発性肝臓において <i>SFRP1</i> 、 <i>SFRP2</i> 、 <i>SFRP5</i> のメチル化が高頻度であることが明らかとなった。さらに HBV あるいは HCV 陽性の慢性肝炎および肝硬変においても <i>SFRP</i> 遺伝子がメチル化していることが明らかとなり、このことから、 <i>SFRP</i> 遺伝子のメチル化に慢性炎症が関与していることが示唆されると共に、 <i>SFRP</i> のメチル化は肝臓癌の早期に起こることが明らかとなった。機能解析の結果では、 <i>SFRP</i> の過剰発現は肝臓癌細胞株における TCF/LEF 転写活性を抑制した。またノックダウン実験では、 <i>SFRP1</i> の抑制のみでは TCF/LEF 転写活性は上昇しないが、 β -catenin の過剰発現に <i>SFRP1</i> の抑制が加わることで TCF/LEF 転写活性が亢進することを明らかにした。本研究結果から、 <i>SFRP</i> が肝臓の予防・早期診断そして治療の新たな分子標的と成り得る事が示唆された。 以上より本論文は博士（医学）の学位授与に値すると審査委員全員の評価を得た。	